

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003100

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-052627  
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 2月27日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-052627  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

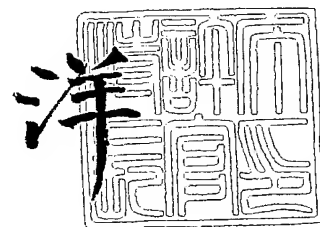
JP2004-052627

出願人 塩野義製薬株式会社  
Applicant(s):

2005年 4月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 04P00007  
【提出日】 平成16年 2月27日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/50  
G01N 33/573

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府摂津市三島2丁目5番1号 塩野義製薬株式会社内  
【氏名】 吉永 智一

【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府摂津市三島2丁目5番1号 塩野義製薬株式会社内  
【氏名】 宍戸 貴雄

【特許出願人】  
【識別番号】 000001926  
【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100108970  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 山内 秀晃  
【電話番号】 06-6455-2056

【選任した代理人】  
【識別番号】 100113789  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 杉田 健一  
【電話番号】 06-6455-2056

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 044602  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9720909  
【包括委任状番号】 9905998

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

(a) テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素をインキュベーションして複合体を形成する工程、

(b) 工程 (a) の後に被検物質を添加し、インキュベーションする工程及び、

(c) 工程 (b) の後に dNTPs を添加し、DNA 合成反応を開始させる工程を含み、

該テンプレートが、 $5'-N_n R m W p X q Z r-3'$  であり、該プライマーが  $3'-Y q$   $-5'$  ( $Y q$  はテンプレートの  $X q$  にハイブリダイズする) であるか、

該テンプレートが、 $5'-N_n R m W p X q-3'$  であり、該プライマーが  $3'-Y q Z r$   $-5'$  ( $Y q$  はテンプレートの  $X q$  にハイブリダイズする) であるか、または、

該基質が、 $5'-N_n R m W p X q Z r Y q-3'$  ( $Y q$  は  $X q$  にハイブリダイズする) である、

ここで、

N はそれぞれ独立して DNA または RNA、

R は RNA、

W はそれぞれ独立して DNA または RNA、

X はそれぞれ独立して DNA または RNA、

Y はそれぞれ独立して DNA または RNA であり、ハイブリダイズする X が DNA の場合は DNA、ハ

イブリダイズする X が RNA の場合は RNA、

Z はそれぞれ独立して DNA または RNA、

n は 13 以上 19 以下の整数、

m は 1 以上の整数、

p は 0 以上の整数、

q は 15 以上の整数 ( $X q$  及び  $Y q$  の q は同意義)、

r は 0 以上の整数である、

逆転写酵素の RNase H 阻害剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 2】

N が RNA、W が RNA、X が RNA、Y が RNA である、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 3】

N が RNA、W が RNA、X が DNA、Y が DNA である、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 4】

q が 18 以上の整数である、請求項 1～3 いずれかに記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 5】

工程 (c) の後に、

(d) テンプレートから切断された核酸量を測定する工程及び、

(e) 該測定値を被検物質非存在下での測定値と比較する工程を含む、請求項 1～4 いずれかに記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 6】

テンプレートが、5' 末端又は 3' 末端が標識されたものである、請求項 5 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 7】

工程 (c) で、逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体の形成阻害剤を dNTPs と共に添加する請求項 1～6 いずれかに記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 8】

該形成阻害剤がヘパリンである、請求項 7 記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 9】

該金属イオンが  $Mg^{2+}$  又は  $Mn^{2+}$  である請求項 1～8 いずれかに記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 10】

該逆転写酵素がウイルスの逆転写酵素である、請求項 1～9 いずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 1 1】

該ウイルスがHIVである請求項 1 0 記載のスクリーニング方法。

【請求項 1 2】

該逆転写酵素が Y 1 8 8 L 耐性変異酵素である、請求項 1 0 記載のスクリーニング方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】逆転写酵素のH型RNA分解酵素阻害剤のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、逆転写酵素の活性を阻害する化合物の探索手段に関する。より詳しくは、逆転写酵素のH型RNA分解酵素 (RNase H) 阻害剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

エイズ (AIDS) や癌は現在でも、人類の主な死因の一つである。これらの病原体であるレトロウイルスは、逆転写酵素、インテグラーゼ及びプロテアーゼの3つのウイルス特異的酵素を利用して宿主細胞内で増殖する。そのため、従来、レトロウイルスが原因とされる病気の予防剤及び治療剤を開発する目的で、ウイルスの特異的酵素の活性を阻害する化合物の探索が求められてきた。

【0003】

レトロウイルスの特異的酵素の1つである逆転写酵素は、二重鎖の核酸と核酸結合部位において結合し、RNAをテンプレートとしてDNAを合成することができるという点に特徴のある酵素として知られており、ポリメラーゼ活性とRNase H活性という2つの酵素活性を持つ。ポリメラーゼの活性中心とRNase Hの活性中心間の距離は約18ヌクレオチドであるが、核酸の配列によって約14~20ヌクレオチドと多様であると推定されている (非特許文献1参照)。それぞれのドメインに2価の金属イオンが結合すると、活性が発現し、ポリメラーゼ活性部位において、テンプレートが転写され、RNase H活性部位において、RNA:DNAヘテロ二重鎖のRNAが加水分解により切断される。逆転写酵素はDNA合成を行う酵素であり、反応開始にテンプレート及びプライマーを必要とするが、テンプレート及びプライマーはRNAでもDNAでも使用することが可能である。また、RNase H活性には、(i) ポリメラーゼによるDNA合成に伴ってテンプレートのRNAを切断するという、ポリメラーゼ依存的RNase H活性と、(ii) ポリメラーゼによるDNA合成を伴わず、逆転写酵素が二重鎖の核酸と結合した際に、RNase H活性部位にRNA:DNAヘテロ二重鎖が存在すると、RNAを切断するという、ポリメラーゼ非依存的RNase H活性が存在する (非特許文献2参照)。

【0004】

現在認可されている、逆転写酵素阻害剤である抗レトロウイルス薬は全てポリメラーゼ活性部位もしくは非核酸系阻害剤結合部位に結合し、ポリメラーゼ活性を阻害する化合物である (非特許文献3参照)。すなわち、RNase H活性を阻害する化合物は新規作用機作の抗ウイルス薬となる可能性があり、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の全ての耐性ウイルスに対して効力を持つことが期待される。現在までに、HIV逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害すること無くRNase H活性を特異的に阻害する化合物として、4-[5-(ベンゾイルアミノ)チエン-2-イル]-2,4-ジオキソブタン酸 (非特許文献4参照) が報告されているが、この化合物は、感染系アッセイにおいてはウイルス増殖を阻害することが出来ない。その他、マブシン類縁体の中にRNase H活性を阻害し、かつ、感染系アッセイにおいてもウイルス増殖を阻害することが出来る化合物が存在することが報告されている (特許文献1参照)。

【0005】

RNase H活性を阻害する逆転写酵素阻害剤をスクリーニングするためにはRNase H活性を測定する必要がある。これまで報告のあるRNase H活性測定法は、テンプレートとしてRNAを、プライマーとしてDNAを用い、両者をハイブリダイズすることによりRNA:DNAヘテロ二重鎖を作製し、金属イオン存在下で酵素の基質とするものであった (非特許文献5参照)。この方法をスクリーニング方法として応用し、基質、金属イオン及び被検物質に逆転写酵素を加えて酵素反応を開始させるアッセイ系が使用されている (特許文献1参照) が、この条件下では、逆転写酵素-基質複合体 (テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質及び逆転写酵素の複合体) が形成されるとすぐ、逆転写酵素のRNase H活性

により、テンプレートが切断される。テンプレートが切断されると、酵素が基質から離れ、ターンオーバーして、別の基質と結合する。そのため、逆転写酵素阻害剤の候補物質としてスクリーニングされた被検物質の作用点について複数の可能性が考えられ、区別するためには更なる実験が必要となる。また、テンプレートが切断される加水分解反応は非常に速やかであるため、被検物質が逆転写酵素-基質複合体に対して結合することでRNase H活性を阻害する働きを持っていた場合、逆転写酵素-基質複合体に対して結合する時間が十分に無い。さらに、逆転写酵素-基質複合体形成反応は酵素反応より時間がかかることから、RNase H阻害物質より、逆転写酵素-基質複合体形成阻害物質の方がスクリーニングされる可能性が高く、RNase H阻害剤のスクリーニング方法としては非常に効率が悪い。

#### 【0006】

これらの欠点を補うために、RNase H活性の発現に必須の金属イオン非存在下で逆転写酵素、基質及び被検物質をプレインキュベーションした後、金属イオンを加えて酵素反応を開始させるアッセイ系が考えられた（非特許文献4及び非特許文献6参照）。しかし、このアッセイ系では、逆転写酵素-基質複合体を形成する際に、金属イオンが存在しない状態であり、本来宿主細胞内で形成される複合体が形成されていない状態で化合物とプレインキュベーションを行っていることになる。そのため、このアッセイ系で得られる化合物は宿主細胞内では機能しない可能性がある。

#### 【0007】

逆転写酵素のRNase Hについてはまだ不明な点も多く、宿主細胞内での働きをin vitroで再現することにより、様々な点を解明しようという研究がされている。その中には、テンプレートとしてRNAとDNAのキメラ核酸、プライマーとしてDNAを使用し、宿主細胞内での逆転写酵素の働きをin vitroで再現した文献がある（非特許文献7参照）。なお、本文献では、テンプレート及びプライマーの配列は逆転写酵素が持つ配列であり、プレインキュベーションの概念が開示されておらず、薬剤のスクリーニング等を示唆していない。

#### 【0008】

【特許文献1】国際公開第03/103610号パンフレット

【非特許文献1】パラニアパン(C. Palaniappan)ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、272巻、11157-11164頁(1997)

【非特許文献2】アーツ(Arts, E. J.)ら、プログレス イン ヌクレイック アシッド リサーチ アンド モレキュラー バイオロジー (Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.)、第58巻、339-393頁(1998)

【非特許文献3】バルニアク(Parniak, M. A.)ら、アドバンスド ファーマコロジー (Adv. Pharmacol.)、第49巻、67-109頁(2000)

【非特許文献4】ショウ-レイド(C. A. Shaw-Reid)ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、278巻、2777-2780頁(2003)

【非特許文献5】リチェツスキー(P. Rychetsky)ら、アナリティカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、第239巻、113-115頁(1996)

【非特許文献6】パラニアパン(C. Palaniappan)ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、270巻、4861-4869頁(1995)

【非特許文献7】ロス(M. J. Roth)ら、ジャーナル オブ ビロロジー (J. Virol.)、74巻、9668-9679頁(2000)

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本発明は、上記、従来法の欠点を克服したRNase H阻害剤のスクリーニング方法を提供することを目的とする。具体的には、本来宿主細胞内で形成される機能的逆転写酵素-基

質複合体に対して作用する阻害剤の検出感度を向上させた新しいRNase H阻害剤のスクリーニング方法を提供する。本発明は、かかるスクリーニング方法により、簡便かつ迅速に、RNase H阻害剤をスクリーニングすることも1つの目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、鋭意研究の結果、本来宿主細胞内で形成される金属イオンが結合した逆転写酵素-基質複合体と被検物質をプレインキュベーションする必要性を考慮し、適切なテンプレートとプライマーを用いることにより、DNA合成反応及び核酸の加水分解反応を起こさずに金属イオン存在下で逆転写酵素-基質複合体を形成させ、該複合体に対して被検物質をプレインキュベーションすることを可能とし、RNase H阻害剤のスクリーニング方法の検出感度向上に成功した。

【0011】

以下に本発明において使用される基質について記載する。

【0012】

本発明においては、逆転写酵素-基質複合体を形成する際に、該逆転写酵素のRNase H活性部位に該当する位置にRNA:RNA又はDNA:DNAのホモ二重鎖を持つような基質を使用する必要がある。例えば、二重鎖の部分が全てホモ二重鎖である基質を用いる。該基質を用いることにより、RNase H反応の開始を抑え、金属イオン存在下における被検物質及び逆転写酵素-基質複合体のインキュベーションが可能になった。

【0013】

また、dNTPsの添加により、ポリメラーゼ反応が進行し、逆転写酵素がテンプレートの端まで進む。従って、本発明においては、逆転写酵素がテンプレートの端まで進んだ際に、RNase H活性部位にテンプレートのRNAが位置するようなテンプレートを使用する必要がある。

【0014】

該テンプレートを用いることにより、被検物質とのインキュベーション後、dNTPsを添加すると、DNA合成反応が起こり、逆転写酵素が移動し、RNase H活性部位がRNA:DNAのヘテロ二重鎖部分に移動することにより、テンプレートが切断され、切断された核酸量を測定することにより、RNase H活性阻害作用を検出することができる。

【0015】

上記、基質を使用することにより、RNase Hドメインに結合し、ポリメラーゼ活性を阻害すること無くRNase H活性を特異的に阻害する化合物をスクリーニングすることが可能になる。

【0016】

また、RNase Hドメインに結合した結果RNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する化合物も、新規作用機作の逆転写酵素阻害剤の候補物質である。しかし、RNase H阻害活性と見かけ上のポリメラーゼ阻害活性がほぼ同等に現れるので、このようなメカニズムのRNase H阻害剤については、RNase H活性部位に変異を導入した酵素などを用いた実験を行うことで作用機作を同定することが可能となる。

【0017】

すなわち、本発明は、

- (1) (a) テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素をインキュベーションして複合体を形成する工程、
  - (b) 工程 (a) の後に被検物質を添加し、インキュベーションする工程及び、
  - (c) 工程 (b) の後にdNTPsを添加し、DNA合成反応を開始させる工程を含み、
- 該テンプレートが、5'-N n R m W p X q Z r - 3'であり、該プライマーが3'-Y q - 5' (Y qはテンプレートのX qにハイブリダイズする) であるか、  
該テンプレートが、5'-N n R m W p X q - 3'であり、該プライマーが3'-Y q Z r - 5' (Y qはテンプレートのX qにハイブリダイズする) であるか、または、  
該基質が、5'-N n R m W p X q Z r Y q - 3' (Y qはX qにハイブリダイズする)



である、  
ここで、  
Nはそれぞれ独立してDNAまたはRNA、  
RはRNA、  
Wはそれぞれ独立してDNAまたはRNA、  
Xはそれぞれ独立してDNAまたはRNA、  
Yはそれぞれ独立してDNAまたはRNAであり、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNA、  
Zはそれぞれ独立してDNAまたはRNA、  
nは13以上19以下の整数、  
mは1以上の整数、  
pは0以上の整数、  
qは15以上の整数（X<sub>q</sub>及びY<sub>q</sub>のqは同意義）、  
rは0以上の整数である、  
逆転写酵素のRNase H阻害剤のスクリーニング方法、  
(2) NがRNA、WがRNA、XがRNA、YがRNAである、(1)記載のスクリーニング方法、  
(3) NがRNA、WがRNA、XがDNA、YがDNAである、(1)記載のスクリーニング方法、  
(4) qが18以上の整数である、(1)～(3)いずれかに記載のスクリーニング方法、  
(5) 工程(c)の後に、  
(d) テンプレートから切断された核酸量を測定する工程及び、  
(e) 該測定値を被検物質非存在下での測定値と比較する工程を含む、(1)～(4)いずれかに記載のスクリーニング方法、  
(6) テンプレートが、5'末端又は3'末端が標識されたものである、(5)記載のスクリーニング方法、  
(7) 工程(c)で、逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体の形成阻害剤をdNTPsと共に、添加する(1)～(6)いずれかに記載のスクリーニング方法、  
(8) 該形成阻害剤がヘパリンである、(7)記載のスクリーニング方法、  
(9) 該金属イオンがMg<sup>2+</sup>又はMn<sup>2+</sup>である(1)～(8)いずれかに記載のスクリーニング方法、  
(10) 該逆転写酵素がウイルスの逆転写酵素である、(1)～(9)いずれかに記載のスクリーニング方法、  
(11) 該ウイルスがHIVである(10)記載のスクリーニング方法、  
(12) 該逆転写酵素がY188L耐性変異酵素である、(10)記載のスクリーニング方法、に関する。

【発明の効果】

【0018】

本発明のスクリーニング方法により、逆転写酵素のRNase H阻害剤を簡便、かつ迅速にスクリーニングすることができる。また、このスクリーニング方法により、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の耐性ウイルスに対して効力を持つ抗ウイルス薬の候補化合物をスクリーニングすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明のスクリーニング方法である「逆転写酵素のH型RNA分解酵素阻害剤のスクリーニング方法」は、従来法と比較して、より簡易で効率的なスクリーニングを行うために、酵素反応を開始させる前に、金属イオン存在下でテンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質及び逆転写酵素の複合体と被検物質をインキュベーションすることを特徴とする。

【0020】

「逆転写酵素」とは二重鎖の核酸と結合し、RNAをテンプレートとして、相補的なDNAを合成する酵素を意味し、一本鎖RNAからDNAを合成するポリメラーゼ活性とRNA:DNAヘテロ二重鎖のRNA部分のみを分解するRNase H活性を持つ。逆転写酵素はDNAポリメラーゼと同様、その反応開始にプライマーを必要とする。テンプレート及びプライマーとしては、RNAもDNAも使用することができる。

#### 【0021】

本明細書においては、特に、ウイルスの逆転写酵素が好ましい。逆転写酵素を有するウイルスとしては、レトロウイルス科に属するウイルスが挙げられる。レトロウイルス科にはレンチウイルス亜科、オンコウイルス亜科、スプーマウイルス亜科等が知られており、レンチウイルス亜科に属するウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス (HIV; Human immunodeficiency virus)、オンコウイルス亜科に属するウイルスとしては、肉腫ウイルス (Sarcoma virus)、成人T細胞白血病ウイルス (HTLV; Human T-lymphotropic virus)、乳癌ウイルス (Mammary tumor virus) 等が挙げられる。特に、HIVが好ましい。

#### 【0022】

「RNase H阻害剤」とはRNase Hドメインに結合し、ポリメラーゼ活性を阻害すること無くRNase H活性を特異的に阻害する化合物、又はRNase Hドメインに結合した結果RNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する化合物のことを意味する。

#### 【0023】

「核酸」とは塩基と糖とが共有結合した化合物であるヌクレオシドの糖分子にリン酸基がエステル結合した化合物であるヌクレオチドを構成単位とした高分子物質である。「DNA」とは、糖部分がデオキシリボースであり、かつ、アデニン、グアニン、シトシン、チミンからなる群より選ばれた塩基を含むヌクレオチドから構成される核酸である。「RNA」とは、糖部分がリボースであり、かつ、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルからなる群より選ばれた塩基を含む核酸である。「キメラ核酸」とはDNAを構成するヌクレオチド及びRNAを構成するヌクレオチドから構成される核酸を意味する。

#### 【0024】

「テンプレート」とは、一本鎖の核酸を意味し、RNA及び/又はDNAから構成される。「プライマー」とは、上記テンプレートの一部に相補的な配列を持ち、テンプレートにハイブリダイズする核酸を意味し、DNA及び/又はRNAから構成され、その3'末端がDNA合成に使われる。「テンプレート」と「プライマー」のハイブリダイズは当該分野で公知の方法により行われ得る。

#### 【0025】

本発明に適した「テンプレート」としては、RNA又はキメラ核酸が挙げられる。本発明に適した「プライマー」としては、テンプレートにハイブリダイズする配列を持つDNA、RNA又はキメラ核酸が挙げられる。それぞれを以下の式で表すことが可能である。

テンプレート:  $5'-N_n R_m W_p X_q Z_r-3'$

プライマー:  $3'-Y_q-5'$

( $Y_q$ は $X_q$ にハイブリダイズする。

$N$ はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$R$ はRNA、

$W$ はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$X$ はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$Y$ はそれぞれ独立してDNAまたはRNAであり、ハイブリダイズする $X$ がDNAの場合はDNA、ハイブリダイズする $X$ がRNAの場合はRNA、

$Z$ はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$n$ は13以上19以下の整数、

$m$ は1以上の整数、

$p$ は0以上の整数、

$q$ は15以上の整数( $X_q$ 及び $Y_q$ の $q$ は同意義)、

$r$ は0以上の整数である。)

## 【0026】

別の様態としては、以下の式で表すことも可能である。

テンプレート:  $5'-N_n R_m W_p X_q-3'$

プライマー:  $3'-Y_q Z_r-5'$

( $Y_q$ は $X_q$ にハイブリダイズする。

$N_n$ 、 $R_m$ 、 $W_p$ 、 $X_q$ 、 $Y_q$ 及び $Z_r$ は全て上記と同意義。)

## 【0027】

「それぞれ独立してDNA又はRNA」とは、テンプレートの一部及びプライマーである核酸を構成している各ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドであることを意味する。すなわち、テンプレートの $N$ 、 $W$ 、 $X$ 、 $Z$ 部分の核酸はヌクレオチドの個数(それぞれ、 $n$ 、 $p$ 、 $q$ 、 $r$ )が条件に合っていれば、RNA、DNA及びキメラ核酸のいずれでもよい。プライマーの $Y$ は、逆転写酵素が二重鎖の核酸に結合してRNA:DNAヘテロ核酸のRNAを切断するポリメラーゼ非依存的RNase H活性を持つことから、DNA合成反応開始前にこのRNase H活性によるテンプレートの加水分解を防ぐために、ハイブリダイズする $X$ 部分の核酸とRNA:RNA又はDNA:DNAのホモ二重鎖を形成するように相補的な配列を持つ核酸であることが好ましい。

## 【0028】

「 $N_n$ 」は逆転写酵素のRNase H活性部位とポリメラーゼ活性部位の活性中心間の距離の長さから1ヌクレオチド短い長さを持つRNA、DNA及びキメラ核酸である。ヌクレオチド( $N$ )が13以上19以下の数だけ重合した核酸が好ましい。

## 【0029】

「 $R_m$ 」は逆転写酵素のポリメラーゼ活性によりDNA合成がテンプレートの5'末端まで進み、続いてRNase H反応が起る際に切断される結合を含むRNAである。リボヌクレオチド( $R$ )が1以上重合したRNAであればよい。

## 【0030】

「 $W_p$ 」はRNA、DNA又はキメラ核酸のいずれでもよく、また、 $p=0$ でもよい。

## 【0031】

「 $X_q$ 」及び「 $Y_q$ 」は相補的な配列を持ち、ハイブリダイズする際に対となるヌクレオチドの糖が同じであれば、RNA、DNA又はキメラ核酸のいずれでもよい。プライマーの長さが15merより短い場合、DNA合成の効率が下がることから、効率良く本発明のスクリーニングを行うために、ヌクレオチド( $X$ 及び $Y$ )が15以上重合した核酸が好ましい。 $q$ の値は、15以上の整数を適宜選択すればよく、18以上の整数である場合が好ましい。また、プライマーは一般には15mer~30merの長さが汎用されており、特に18mer~25merの長さが好ましい。

## 【0032】

逆転写酵素は、テンプレートとプライマーがハイブリダイズした二重鎖のリン酸部分を認識して結合する。逆転写酵素のRNase H活性部位はRNA:DNAのヘテロ二重鎖のRNAを認識して切断する。上記の認識、結合、切断は共に配列非特異的である。そのため、テンプレート及びプライマーは、上記条件に合う核酸であれば特定の配列に限定されない。

## 【0033】

テンプレート及びプライマーの長さは、酵素の種類によって適宜選択すればよく、例えば、約50塩基の長さのテンプレート及び25merのプライマーを使用することができる。

## 【0034】

テンプレートが、5'末端側にRNA、3'末端側にDNAを持つキメラ核酸である時、該RNAの長さが17mer以上、該DNAの長さが15mer以上、特に、該RNAの長さが19mer以上、該DNAの長さが18mer以上であるキメラ核酸が好ましい。

## 【0035】

テンプレートがキメラ核酸である時、プライマーは、テンプレートのDNAにハイブリダイズする15mer以上のDNAであることが好ましい。

## 【0036】

特に、19～25merのRNAを持ち、RNAの3'末端側に18～25merのDNAを持つキメラ核酸であるテンプレート及び18～25merのプライマーの組み合わせが特に好ましい。

## 【0037】

また、基質として1本鎖の核酸を使用することもできる。例えば、上記「テンプレート」の3'末端と上記「プライマー」の5'末端はリン酸ジエステル結合により結合して一本鎖となってもよい。このような基質は次のような式で表すことができる。

基質: 5'-N n R m W p X q Z r Y q- 3'

(N n、R m、W p、X q、Z r、Y qは全て上記と同意義。)

## 【0038】

「金属イオン」としては、2価金属イオンが好ましく、例えば、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 等が挙げられる。特に、 $Mg^{2+}$ 及び $Mn^{2+}$ が好ましい。

## 【0039】

「被検物質」とは、スクリーニングに使用される物質を意味し、化合物又はその塩が挙げられる。なお、本明細書においては、前記化合物又はその塩は、低分子化合物、高分子化合物、ポリペプチド又はその誘導体等を含む。かかる被検物質は、天然物質であってもよく、非天然物質であってもよい。ポリペプチドの誘導体としては、修飾基を付加して得られた修飾ポリペプチド、アミノ酸残基を改変することにより得られたバリエーションポリペプチド等が挙げられる。

## 【0040】

「dNTPs」とは、デオキシヌクレオチド三リン酸の混合物を意味し、DNA合成に使用される基質、デオキシアデニル三リン酸(dATP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、デオキシチジン三リン酸(dCTP)、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)から構成されている。

## 【0041】

「阻害剤」とは酵素反応を阻害する物質を意味する。指標としては、一般的には、酵素活性を50%阻害することができる薬剤濃度(IC<sub>50</sub>値)が使用される。阻害剤としては、IC<sub>50</sub>値が100 μM以下、特に、10 μM以下、さらには、1 μM以下の物質が好ましい。

## 【0042】

「逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体の形成阻害剤」とは逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体形成を阻害する化合物である。本発明においては、工程(b)において基質と結合していない逆転写酵素が工程(c)において基質と結合し、酵素活性を発現することを回避すること、あるいは工程(c)においてdNTPsを入れて酵素反応を開始させた後に、逆転写酵素がターンオーバーすることにより、再度基質と複合体を形成してRNase H反応が起る、という事態を回避することを目的として使用される。

## 【0043】

該阻害剤としては、逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体形成を阻害する性質を持つ化合物であれば、使用することができ、例えば、ヘパリン、二本鎖核酸等が挙げられる。

## 【0044】

現在、逆転写酵素の阻害剤としてNevirapine等の非核酸系阻害剤もスクリーニングされており、これらの化合物はHIVの逆転写酵素の非核酸系阻害剤結合部位に結合することが知られている。また、現在知られている大半の非核酸系阻害剤はY188Lの変異によって耐性を獲得することが知られている。

## 【0045】

本発明のスクリーニング方法において、HIV 野生型逆転写酵素を用いた場合、RNase Hドメインに結合した結果RNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する化合物は、RNase H阻害活性と見かけ上のポリメラーゼ阻害活性がほぼ同等に現れるので、非核酸系逆転写酵素阻害剤と測定結果がほぼ同じになる。

## 【0046】

そこで、188番目のチロシンをロイシンに変異させたY188L耐性変異酵素を使用すると、ポリメラーゼ阻害活性を有し、Nevirapine等と交差耐性を持つような被検物質が酵素の働きを阻害する可能性を除外することができ、効率良くRNase H阻害剤をスクリーニングすることができる。

## 【0047】

本発明は、上記の適切なテンプレートとプライマーの選択により、金属イオン存在下で逆転写酵素-基質複合体と被検物質とのプレインキュベーションを可能にしたという特徴を持つスクリーニング方法に関するものであり、検出方法などは公知のものを利用することができるが、特に、莫大な数の化合物をアッセイするスクリーニング、特にハイスルーットスクリーニング (HTS) において有用である。本発明を実施すれば、ノイズ (擬陽性) を減少させることができ、効果的に候補化合物を選択することができる。

## 【0048】

本発明のスクリーニング方法としては、具体的には、

- (a) テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素をインキュベーションして複合体を形成する工程、
- (b) 工程 (a) の後に被検物質を添加し、インキュベーションする工程、
- (c) 工程 (b) の後にdNTPsを添加し、DNA合成反応を開始させる工程、
- (d) テンプレートから切断された核酸量を測定する工程及び、
- (e) 該測定値を被検物質非存在下での測定値と比較する工程を含む、スクリーニング方法が挙げられる。

## 【0049】

前記工程 (a) のインキュベーションは、該逆転写酵素の本来の機能を妨げない溶液中において、テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素とを混合し、適切な反応条件、例えば、適切な反応温度、反応時間の下、維持することによって行われ得る。

## 【0050】

前記「酵素の本来の機能を妨げない溶液」としては、例えば、MOPSバッファー、HEPESバッファー、Trisバッファー等が挙げられる。

## 【0051】

また、前記「適切な反応条件」としては、特に限定されないが、例えば、MOPSバッファー、HEPESバッファー、Trisバッファー等の溶液中、pH 6.0~10.0、好ましくは、pH 7.0~8.0、さらに好ましくは、pH 7.4で、4℃~50℃、好ましくは、25℃~37℃、さらに好ましくは、25℃、1分~1時間、好ましくは5分~20分、さらに好ましくは、10分維持すること等が挙げられる。より具体的には、50 mM MOPS(pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、2 mM EDTA、34 mM KCl、0.48 mM 基質中、前記条件下に維持することが挙げられる。

## 【0052】

前記工程 (b) のインキュベーションは、該複合体の本来の機能を妨げない溶液中において、前記複合体と被検物質とを混合し、適切な反応条件、例えば、反応温度、反応時間等の下、維持することにより行なわれうる。溶液及び反応条件については、前記 (a) のインキュベーション時と同様に行われ得る。工程 (b) の適切なインキュベーション時間は、被検物質化合物によって異なるため、特に限定はされないが、好ましくは5分以上、より好ましくは10分以上、更に好ましくは15分以上維持することが挙げられる。工程 (b) のインキュベーションが不十分であれば被検物質の阻害活性が見いだせないということが起こり得る。

## 【0053】

前記工程 (c) のDNA合成は、逆転写酵素-基質複合体の本来の機能を妨げない溶液中において、前記複合体と被検物質とを混合し、適切な反応条件、例えば、反応温度、反応時間等の下、維持することにより行なわれうる。溶液及び反応条件については、前記 (a)

のインキュベーション時と同様に行われ得る。

#### 【0054】

前記工程 (d) のテンプレートから切断された核酸量を測定する方法としては、特に限定されず、当該分野において、一般的に、酵素活性を測定するために、核酸量を測定する方法として知られている方法を使用することができる。例えば、前記テンプレートから切断される核酸部分をあらかじめ標識しておけばよい。慣用の蛍光色素、放射性物質、ジゴキシゲニン等で標識することができる。標識部位はテンプレートの 5' 末端又は 3' 末端が好ましい。テンプレートから切断された核酸量の検出は、慣用の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動等において、オートラジオグラフィや蛍光物質による可視化、標識テンプレートに基づく検出等を行なうこと等により行なわれうる。具体的には、エライザ法、蛍光エネルギー転移反応、時間分解蛍光法 (HTRF) 等が挙げられる。

#### 【0055】

工程 (e) において、前記工程 (d) における結果と、被検物質非存在下での測定値とを比較することによって、RNase H 活性の阻害の有無を確認することができる。被検物質非存在下においては、逆転写酵素は本来の働きを果たし、テンプレートの 5' 末端側の核酸が切断される。そのため、基質として使用したテンプレートより短い核酸の断片が検出される。前記工程 (d) の短い核酸断片の測定結果が、被検物質非存在下での測定値と比較して、同等あるいはそれ以上であれば、該被検物質は RNase H 阻害剤として使用することはできない。

#### 【0056】

一方、前記工程 (d) の短い核酸断片の測定結果が、被検物質非存在下での測定値と比較して、それ以下あるいは測定限界以下の値であれば、該被検物質は RNase H 阻害剤となり得る。

#### 【0057】

但し、被検物質が、現在知られている逆転写酵素阻害剤のようにポリメラーゼ阻害作用を持つ場合も存在する。該被検物質がポリメラーゼ阻害作用を持つ場合、DNA 合成反応が開始せず、酵素が移動しないことから、RNase H 反応は起らない。そのため、前記工程 (d) の短い断片の測定結果が、被検物質非存在下での測定値と比較して、それ以下あるいは測定限界以下の値となる。このことから、RNase H 阻害剤を目的としてスクリーニングを行う場合、さらに、被検物質が逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害する物質か否かを確認する必要がある。

#### 【0058】

被検物質が逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害するか否かを確認する方法としては、特に限定されず、当該分野において、公知のポリメラーゼ活性を測定するアッセイを使用することができる。例えば、ショウ-レイド (C. A. Shaw-Reid) ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、278 巻、2777-2780 頁 (2003) に記載の RNA 依存的 DNA ポリメラーゼ活性測定法などが、挙げられる。

#### 【0059】

また、本スクリーニング方法を利用する場合、工程 (a) ~ (c) まで行った後、プライマーの長さを測定することによって確認することができる。該被検物質がポリメラーゼ活性を阻害するならば、プライマーの長さは、工程 (a) の時点と変化しない。該被検物質がポリメラーゼ活性を阻害することなく RNase H 活性を特異的に阻害する物質であれば、プライマーは工程 (c) の DNA 合成により伸長され、最初のプライマーより長い核酸が検出される上に、テンプレートの切断が検出されない。また該被検物質が RNase H ドメインに結合した結果 RNase H 活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する物質であれば、プライマーの伸長阻害とテンプレートの切断阻害はほぼ同等に現れることになる。

#### 【0060】

DNA 合成により伸長したプライマー量を測定する方法としては、特に限定されず、当該分野において、一般的に、核酸量を測定する方法として知られている方法を使用することができる。例えば、前記プライマーをあらかじめ標識しておけばよい。慣用の蛍光色素、

放射性物質、ジゴキシゲニン等で標識することができる。標識部位はプライマーの5'末端が好ましい。伸長したプライマーの検出は、慣用の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動等において、オートラジオグラフィーや蛍光物質による可視化、標識プライマーに基づく検出等を行なうこと等により行なわれ得る。具体的には、エライザ法、蛍光エネルギー転移反応、時間分解蛍光法 (HTRF) 等が挙げられる。

#### 【0061】

金属イオンは逆転写酵素の活性に必須の因子であり、RNase H活性部位とポリメラーゼ活性部位に結合することが知られている。当該分野で既知であるポリメラーゼ活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばD185N変異酵素又はRNase H活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばD433N変異酵素等を使用した、既知のRNase H活性測定法及び本発明のスクリーニング方法により、該被検物質がポリメラーゼ活性部位又はRNase H活性部位に金属イオンを介して直接的に結合してその機能を調節しているか否かを検出することも可能である。

#### 【0062】

RNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する化合物阻害剤については、化合物の金属イオン依存性に関わらず、ポリメラーゼ活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばY188L変異酵素又はRNase H活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばY501W変異酵素等を使用した、既知のRNase H活性測定法及び本発明のスクリーニング方法により、該被検物質がポリメラーゼ活性部位あるいはRNase H活性部位に結合してその機能を調節しているか否かを検出することも可能である。

#### 【0063】

本発明のスクリーニング法により得られた化合物又はその塩は、RNase Hに関連して逆転写酵素を持つ病原体により引き起こされる病気に対する治療又は予防作用を発揮し得る。したがって、前記スクリーニング方法により得られた化合物又はその塩により、RNase Hに関連する疾患、癌やエイズなどの治療又は予防に用いるための医薬組成物が提供される。

#### 【0064】

本発明のスクリーニング方法により得られた化合物又はその塩を有効成分として含有する医薬組成物は、前記RNase Hの機能に関連する疾患、該機能に関連して発症する疾患に対して、該RNase Hの機能の阻害を介して作用するという優れた効果を発揮する。また、該医薬組成物によれば、癌、AIDS、特に、前記RNase Hの機能に関連して発症する癌及びAIDSに対して、該機能の阻害を介して作用するという優れた効果を発揮する。したがって、該医薬組成物によれば、逆転写酵素のポリメラーゼ、インテグラーゼ及びプロテアーゼの活性を阻害することに基づく既存の抗ウイルス薬とは異なる作用機序によりウイルス性疾患を改善することができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0065】

上記の医薬組成物中における前記化合物又はその塩の含有量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができ、治療上有効量であればよく、低分子化合物又は高分子化合物の場合、例えば、0.0001～1000mg、好ましくは、0.001～100mg、ポリペプチド又はその誘導体の場合、例えば、0.0001～1000mg、好ましくは、0.001～100mgであることが望ましい。

#### 【0066】

上記の医薬組成物は、前記化合物又はその塩を安定に保持しうる種々の助剤をさらに含有してもよい。具体的には、有効成分の送達対象となる部位に到達するまでの間に、有効成分が分解することを抑制する性質を呈する薬学的に許容されうる助剤、賦形剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等が挙げられる。

#### 【0067】

上記の医薬組成物の投与形態は、有効成分の種類；投与対象となる個体、器官、局所部位、組織；投与対象となる個体の年齢、体重等に応じて、適宜選択される。前記投与形態としては、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、局所投与等が挙げられる。



## 【0068】

また、上記の医薬組成物の投与量も、有効成分の種類；投与対象となる個体、器官、局所部位、組織；投与対象となる個体の年齢、体重等に応じて、適宜選択される。投与としては、特に限定されないが、有効成分が、低分子化合物又は高分子化合物である場合、前記有効成分の量として、例えば、0.0001～1000mg/kg体重、好ましくは、0.001～100mg/kg体重、ポリペプチド又はその誘導体の場合、例えば、0.0001～1000mg/kg体重、好ましくは、0.001～100mg/kg体重の1回投与量となるように、1日につき、複数回、例えば、1～3回投与すること等が挙げられる。

## 【実施例1】

## 【0069】

基質の調製

プロリゴ社により合成されたRNA-DNAキメラ核酸、およびキアゲン社により合成されたDNAプライマーをハイブリダイズさせたものを基質（図1）として使用した。RNase H活性阻害作用を調べる際にはテンプレート側、ポリメラーゼ活性阻害作用を調べる際にはプライマー側の5'末端をそれぞれT4 polynucleotide kinaseと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を使って標識したものを使用する。標識した核酸は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて精製後、等モルの未標識相補鎖と共にKTEバッファー液（組成：80mM KCl、1mM EDTA、10mM Tris-塩酸（pH 8.0））中で混合し、85℃で15分間加熱後、ゆるやかに温度を下げて相補鎖同士をハイブリダイズさせてから用いた。

## 【実施例2】

## 【0070】

酵素反応

ポリプロピレン製のチューブに、酵素反応液（組成：50 mM MOPS（pH7.4）、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、2 mM EDTA、34 mM KCl、0.48 nM 基質）を10.25μl分注した。次にHIVの逆転写酵素を含む酵素溶液（0.1 pmol 逆転写酵素）1μlを加え、良く混合した。室温で10分間インキュベート後、被検化合物のDMSO溶液1.25μl、ポジティブコントロール（PC）およびネガティブコントロール（NC）には、DMSO 1.25μlを加え、よく混合した。室温で15分間インキュベート後、反応開始液（組成：1 mg/mL ヘパリン、0.1 mM dNTPs）1μlを加え、室温で10分間インキュベートした後、反応停止液（組成：45% formamide、5 mM EDTA、0.05% bromo phenol blue、0.05% xylene cyanol）12.5μlを加えた。NCについては反応開始液添加前に反応停止液12.5μlを加えることで予め反応を停止させた。なお、表記濃度は全て終濃度である。

## 【実施例3】

## 【0071】

阻害率（IC50値）の測定

反応液を85℃で5分間加熱し、氷上で2分間急冷後、変性ポリアクリルアミドゲル（ゲル組成：8M urea、20% acrylamide）にて電気泳動を行い、反応産物を分離した。BAS Stat ion ver.3.0（Fujifilm）にて反応産物のバンド強度を定量し、以下の計算式に従ってRNase H反応阻害率、ポリメラーゼ反応阻害率をそれぞれ求めた。被検化合物として、RNase H阻害剤（化合物1；4-[5-（ベンゾイルアミノ）チエン-2-イル]-2,4-ジオキソブタン酸）、コントロール化合物として、逆転写酵素に非特異的に結合するsuramin sodium及び非核酸系逆転写酵素阻害剤であるnevirapineを使用した。

## 【0072】

図2に化合物1のオートラジオグラフィー図と阻害率を示す。図3に化合物1の濃度-阻害曲線を示す。表1にHIVの野生型逆転写酵素を使用した場合のIC50値を示す。単位はμg/mlである。表2にHIVのY188L耐性変異酵素を使用した場合のIC50値を示す。単位はμg/mlである。なお、表記濃度は全て終濃度である。



$$\text{阻害率 (\%)} = 100[1 - ((\text{C density} - \text{NC density}) / (\text{PC density} - \text{NC density}))]$$

C density : 化合物を加えた場合の酵素反応物のバンド強度

NC density : NCの酵素反応物のバンド強度

PC density : PCの酵素反応物のバンド強度

$$\text{IC50値} = B - (Y - 50)(B - A) / (Y - X)$$

X : 化合物濃度Aのときの阻害率

Y : 化合物濃度Bのときの阻害率

A, B : 阻害率50%をはさむ2点の化合物濃度

【表 1】

No.	プレインキュベーションなし <sup>(a)</sup>		プレインキュベーションあり			
	RNaseH	Polymerase	金属コファクターなし <sup>(b)</sup>		金属コファクターあり	
			RNaseH	Polymerase	RNaseH	Polymerase
化合物1	>100	>100	>100	>100	30	>100
suramin	>100	>100	≒POL	21	≒POL	3.2
nevirapine	≒POL	10	≒POL	0.18	≒POL	0.34

(a) プレインキュベーションなし; 金属コファクター存在下、形成された逆転写酵素-基質複合体に対して被検化合物のDMSO溶液と反応開始液を同時に添加する

(b) プレインキュベーションあり、金属コファクターなし; 金属コファクター非存在下で逆転写酵素-基質複合体を形成させ、被検化合物のDMSO溶液を加えてプレインキュベーションした後、金属コファクターと反応開始液を同時に添加する

【表 2】

No.	プレインキュベーションなし		プレインキュベーションあり			
	RNaseH	Polymerase	金属コファクターなし		金属コファクターあり	
			RNaseH	Polymerase	RNaseH	Polymerase
化合物1	>100	>100	>100	>100	24	>100
suramin	>100	>100	≒POL	13	≒POL	3.2
nevirapine	>100	>100	>100	>100	>100	>100

数値はIC50 (μg/mL)

## 【0073】

これらの結果から、化合物1は、ポリメラーゼ反応を阻害することなくRNase H活性を特異的に阻害するRNase H阻害剤であるが、その阻害活性を感度良く検出するためには、金属イオン存在下で構築される逆転写酵素-基質複合体に対してプレインキュベーションすることが肝要である。また野生型逆転写酵素の代わりに非核酸系逆転写酵素阻害剤が耐性になるY188L耐性変異酵素を使用すると、Nevirapineのポリメラーゼ阻害活性は消失す

るがsuramin sodiumの阻害活性は野生型逆転写酵素を使用した場合とほぼ同等である。このことから、野生型逆転写酵素の代わりにY188L耐性変異酵素を使用することで、Nevirapine等と交差耐性を持つような被検物質が酵素の働きを阻害する可能性を除外することができるため、目的とするRNaseH阻害剤を効率よくスクリーニングすることができる。suramin sodiumは、ポリメラーゼ活性とRNase H活性を同時に阻害するものであるが、非核酸系逆転写酵素阻害剤である可能性は低く、作用部位同定のためにいはポリメラーゼ変異酵素、RNaseH変異酵素等を用いた更なる実験が必要である、ということが言える。一般に様々な酵素系で阻害活性が報告されており、非特異的蛋白結合物質である。

#### 【実施例 4】

##### 【0074】

#### 蛍光エネルギー転移反応を利用した阻害率 (IC50値) の測定

テンプレートの3'末端をジゴキシングニンで標識し、アッセイプレートに固定する。テンプレートの5'末端は6-FAM等の蛍光物質で標識する。dNTPsの中に予め蛍光物質のクエンチャーであるTAMRA等で標識されたデオキシヌクレオチド三リン酸を加えておき、ポリメラーゼ反応終了時には蛍光物質近辺に、ポリメラーゼ反応により取り込まれたデオキシヌクレオチド-クエンチャーが存在し、蛍光物質から発せられる蛍光を消光させることができるようにテンプレート、プライマーの塩基配列を設計する。反応終了後、6-FAMの消光の度合いを測定することでポリメラーゼ阻害活性を測定することが可能である。次にRNase H活性によって切断されたテンプレート断片がアッセイプレートから解離するような洗浄条件で洗浄した後、プレートに残存する6-FAMによる蛍光を測定することでRNase H阻害活性を測定することが可能である。その結果、逆転写酵素のRNase H阻害剤の候補化合物をスクリーニングすることができる。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0075】

本発明のスクリーニング方法を使用することによりポリメラーゼ依存的RNase H活性を阻害する化合物を効率的にスクリーニングすることができる。スクリーニングされたRNase H阻害剤は新規作用機作の抗ウイルス薬であり、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の耐性ウイルスに対して効力を持つ抗ウイルス薬を開発することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0076】

【図1】 キメラ基質の構造

【図2】 HIV Y188L耐性変異酵素を用いた場合の化合物1のRNase H阻害率とポリメラーゼ阻害率

【図3】 HIV Y188L耐性変異酵素を用いた場合の化合物1の濃度-阻害率曲線

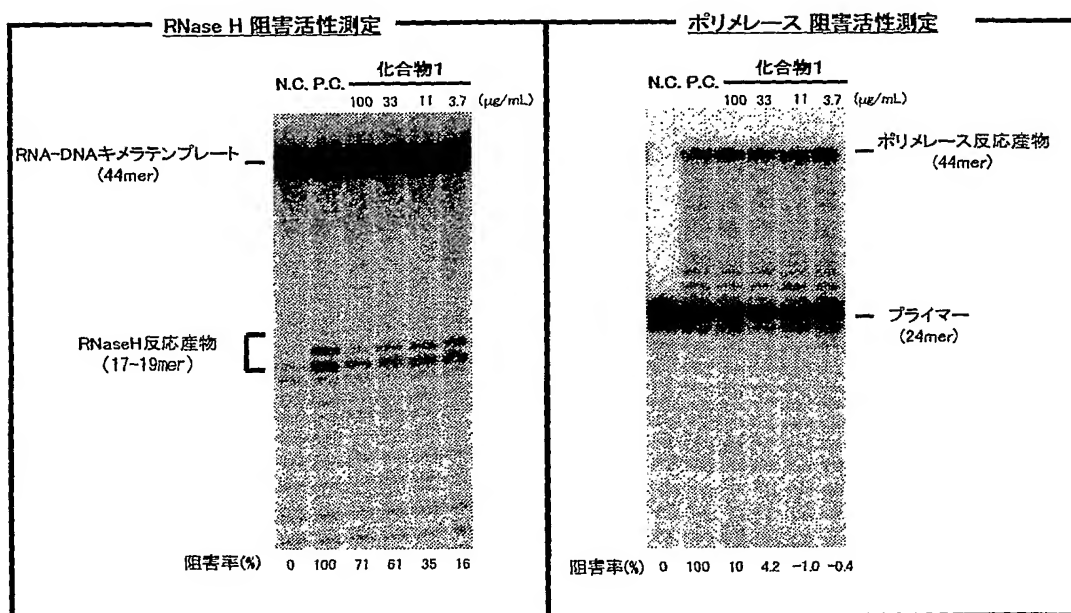
【書類名】 図面

【図 1】

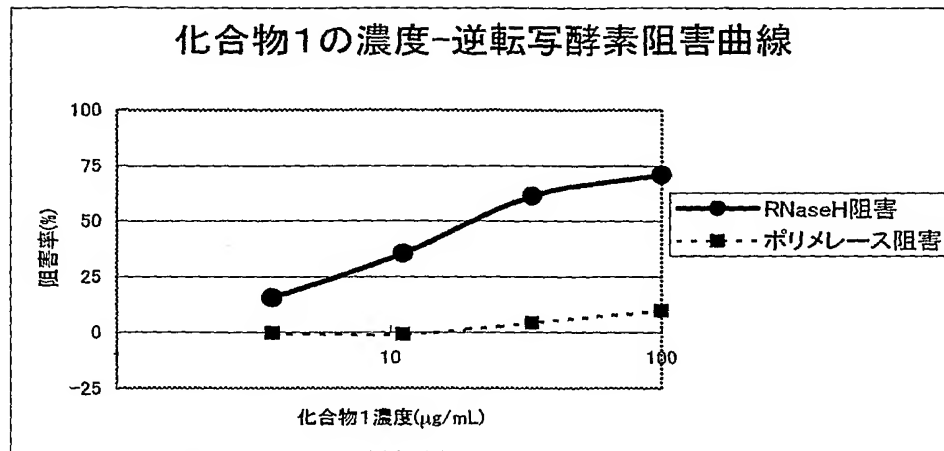
(キメラ基質の構造: 下線は RNA、それ以外は DNA)

5'-CAG UCC UCU AUU GUG UGC ATC AAA GGA TAG ATG TAA AAG ACA CC-3'  
3'-G TTT CCT ATC TAC ATT TTC TGT GG-5'

【図 2】



【図 3】



$$\begin{aligned} \text{IC}_{50}\text{値} &= B - (Y - 50)(B - A) / (Y - X) \\ &= 33.3 - (61.1 - 50)(33.3 - 11.1) / (61.1 - 35.3) \\ &= 24 \end{aligned}$$

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ポリメラーゼ依存的RNase H活性を阻害する物質のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】

テンプレート:  $5' - N_n R_m W_p X_q Z_r - 3'$

プライマー:  $3' - Y_q - 5'$

( $Y_q$  は  $X_q$  にハイブリダイズする。

$N$  はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$R$  はRNA、

$W$  はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$X$  はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$Y$  はそれぞれ独立してDNAまたはRNAであり、ハイブリダイズする  $X$  がDNAの場合はDNA、ハイブリダイズする  $X$  がRNAの場合はRNA、

$Z$  はそれぞれ独立してDNAまたはRNA、

$n$  は13以上19以下の整数、

$m$  は1以上の整数、

$p$  は0以上の整数、

$q$  は15以上の整数 ( $X_q$  及び  $Y_q$  の  $q$  は同意義)、

$r$  は0以上の整数である。)を用いることにより、金属イオン存在下で形成される逆転写酵素-基質複合体に対して被検化合物をプレインキュベーションすることを可能とし、RNase H阻害剤のスクリーニング方法確立した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 5 2 6 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 2 6 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号

氏 名

塩野義製薬株式会社